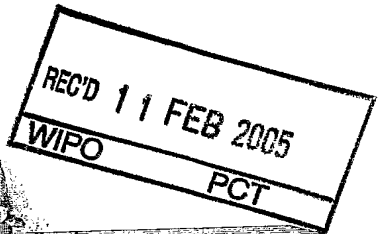


22-0105



PA 1260305



THE UNITED STATES OF AMERICA

TO ALL TO WHOM THESE PRESENTS SHALL COME:

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE

United States Patent and Trademark Office

December 14, 2004

**THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED HERETO IS A TRUE COPY FROM
THE RECORDS OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK
OFFICE OF THOSE PAPERS OF THE BELOW IDENTIFIED PATENT
APPLICATION THAT MET THE REQUIREMENTS TO BE GRANTED A
FILING DATE UNDER 35 USC 111.**

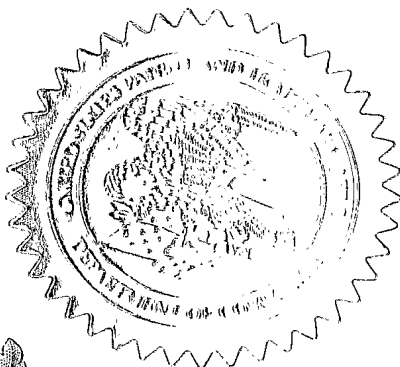
APPLICATION NUMBER: 60/543,549

FILING DATE: February 12, 2004

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

**By Authority of the
COMMISSIONER OF PATENTS AND TRADEMARKS**



W. Montgomery
W. MONTGOMERY
Certifying Officer

Please type a plus sign (+) inside this box → ☐

PTO/SB/16 (8-00)
Approved for use through 10/31/2002. OMB 0651-0032
Patent and Trademark Office; U.S. DEPARTMENT OF COMMERCE
Under the Paperwork Reduction Act of 1995, no persons are required to respond to a collection of information unless it displays a valid OMB control number.

PROVISIONAL APPLICATION FOR PATENT COVER SHEET

This is a request for filing a PROVISIONAL APPLICATION FOR PATENT under 37 CFR 1.53 (c).

INVENTOR(S)				
Given Name (first and middle (if any))	Family Name or Surname	Residence (City and either State or Foreign Country)		
<input type="checkbox"/> Additional inventors are being named on the _____ separately numbered sheets attached hereto				
TITLE OF THE INVENTION (280 characters max)				
HOCHKONZENTRIERTE, FULUSSIGE FORMULIERUNGEN VON ANTI-EGFR-ANTIKORPERN				
CORRESPONDENCE ADDRESS				
Direct all correspondence to:				
<input checked="" type="checkbox"/> Customer Number <input type="text" value="23599"/>				
OR <input type="checkbox"/> Firm or Individual Name <input type="text"/>				
Address <input type="text"/>				
Address <input type="text"/>				
City <input type="text"/>		State <input type="text"/>	ZIP <input type="text"/>	
Country <input type="text"/>		Telephone <input type="text"/>	Fax <input type="text"/>	
ENCLOSED APPLICATION PARTS (check all that apply)				
<input checked="" type="checkbox"/> Specification Number of Pages <input type="text" value="44"/>		<input type="checkbox"/> CD(s), Number <input type="text"/>		
<input type="checkbox"/> Drawing(s) Number of Sheets <input type="text"/>		<input type="checkbox"/> Other (specify) <input type="text"/>		
<input type="checkbox"/> Application Data Sheet. See 37 CFR 1.76				
METHOD OF PAYMENT OF FILING FEES FOR THIS PROVISIONAL APPLICATION FOR PATENT (check one)				
<input type="checkbox"/> Applicant claims small entity status. See 37 CFR 1.27.				
<input checked="" type="checkbox"/> A check or money order is enclosed to cover the filing fees				
<input type="checkbox"/> The Commissioner is hereby authorized to charge filing fees or credit any overpayment to Deposit Account Number: <input type="text"/>			FILING FEE AMOUNT (\$) <input type="text" value="160.00"/>	
<input type="checkbox"/> Payment by credit card. Form PTO-2038 is attached.				
The invention was made by an agency of the United States Government or under a contract with an agency of the United States Government.				
<input type="checkbox"/> No.				
<input type="checkbox"/> Yes, the name of the U.S. Government agency and the Government contract number are: _____				

Respectfully submitted,
SIGNATURE

TYPED or PRINTED NAME Anthony J. Zelano

TELEPHONE (703) 243-6333

Date 2/12/2004

REGISTRATION NO. 27,969
(if appropriate)

Docket Number: MERCK-2850V1

USE ONLY FOR FILING A PROVISIONAL APPLICATION FOR PATENT

This collection of information is required by 37 CFR 1.51. The information is used by the public to file (and by the PTO to process) a provisional application. Confidentiality is governed by 35 U.S.C. 122 and 37 CFR 1.14. This collection is estimated to take 8 hours to complete, including gathering, preparing, and submitting the complete provisional application to the PTO. Time will vary depending upon the individual case. Any comments on the amount of time you require to complete this form and/or suggestions for reducing this burden, should be sent to the Chief Information Officer, U.S. Patent and Trademark Office, U.S. Department of Commerce, Washington, D.C., 20231. DO NOT SEND FEES OR COMPLETED FORMS TO THIS ADDRESS. SEND TO: Mail Stop Provisional Application, Commissioner of Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450.

- 1 -

HOCHKONZENTRIERTE, FLÜSSIGE FORMULIERUNGEN VON ANTI-EGFR-ANTIKÖRPERN

Hintergrund der Erfindung

5

10

15

20

Die Erfindung betrifft Verfahren zur Herstellung hochkonzentrierter, flüssiger Formulierungen enthaltend wenigstens einen anti-EGFR-Antikörper und/oder eine seiner Varianten und/oder Fragmente, insbesondere monoklonale Antikörpern gegen den EGF-Rezeptor, besonders bevorzugt von Mab C225 (Cetuximab) und Mab h425 (EMD 72000), durch Ultrafiltration. Die Erfindung betrifft weiterhin hochkonzentrierte, flüssige Formulierungen von anti-EGFR-Antikörpern, insbesondere von monoklonalen Antikörpern gegen den EGF-Rezeptor, besonders bevorzugt von Mab C225 (Cetuximab) und Mab h425 (EMD 72000) und/oder deren Varianten und/oder Fragmente, dadurch gekennzeichnet, dass die hochkonzentrierte, flüssige Formulierungen einen Gehalt von anti-EGFR-Antikörpern von 10 – 200, bevorzugt 50 – 180 mg/ml, besonders bevorzugt von 100 – 150 mg/ml aufweisen und deren Verwendung.

25

30

35

Fortschritte im Bereich der Biotechnologie machten es im Laufe der letzten 10 Jahre möglich eine Reihe von Proteinen zur pharmazeutischen Anwendung mittels rekombinanter DNA-Techniken herzustellen. Proteinarzneimittel wie monoklonale Antikörper finden ihre Anwendung beispielsweise in der Tumorthherapie, z.B. zur spezifischen Immuntherapie oder Tumorstabilisierung. Therapeutische Proteine sind größer und komplexer als herkömmliche organische und anorganische Wirkstoffe und sie weisen komplexe dreidimensionale Strukturen und zahlreiche funktionelle Gruppen auf, die die biologische Aktivität des Proteins bedingen oder auch unerwünschte Wirkungen hervorrufen können.

- 2 -

Proteinarzneimittel sind während Herstellung, Lagerung und Transport zahlreichen exogenen Einflüssen ausgesetzt, die sich stabilitätsmindernd auf den Proteinwirkstoff auswirken können. Es ist daher erforderlich, die Ursachen und Mechanismen der speziellen Abbaureaktionen genau zu studieren, um z.B. durch Zusatz bestimmter stabilisierender Hilfsstoffe das Protein stabilisieren zu können (siehe z.B. Manning M.C., Patel K., & Borchardt R.T. (1989) Stability of protein pharmaceuticals. Pharm. Res. 6, 903-918).

Aus der Literatur sind zahlreiche Formulierungen therapeutischer Proteine bekannt. Die Anforderungen an die Zusammensetzung einer pharmazeutischen Zubereitung von Proteinwirkstoffen können jedoch sehr unterschiedlich sein und im Allgemeinen ist es aufgrund spezifischer physikochemischer Eigenschaften und Abbaureaktionen der unterschiedlichen Proteine nicht möglich, bereits etablierte Proteinformulierungen auf neue Protein-Wirkstoffe zu übertragen. Deshalb sind geeignete pharmazeutische Formulierungen dieser neuartigen Wirkstoffe noch immer eine große Herausforderung.

In bisheriger Literatur wird zwar die Ultrafiltration als Standardmethode im Downstreamprocessing bei der Aufreinigung von rekombinaten Proteinen beschrieben (Taylor and Francis (2000) Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins, London, p. 1-212; McPherson A. (1989) Separation Methods, Preparation and Analysis of Protein Crystals: New York, Robert E. Krieger Publishing Co., Inc., p. 1-51) allerdings werden beim Downstreamprocessing keine vorteilhaft hohen Konzentrationen erzielt. Zudem kommt es durch nachfolgende Aufreinigungs- und Chromatographieschritte wieder zur Verdünnung der erhaltenen Prozesslösungen.

Die US 6,252,055 beschreibt zwar die Herstellung von hochkonzentrierten Antikörperformulierungen mittels Ultrafiltration, allerdings weisen die so

- 3 -

5 hergestellten Antikörperformulierungen bereits direkt nach Herstellung einen hohen Anteil an löslichen Aggregaten von $\geq 4\%$ auf. Zudem werden die erhaltenen Antikörperformulierungen nicht hinsichtlich ihrer nativen Struktur und Stabilität charakterisiert, was als sehr wichtig im Hinblick auf die Immunogenität der Antikörperformulierung anzusehen ist.

10 Formulierungen enthaltend Mab C225 (Cetuximab) oder Mab h425 (EMD 72000) sind zwar aus der WO03053465 und aus der WO03007988 bekannt, jedoch weisen die aus der WO03053465 bekannten Formulierungen eine relativ geringe Proteinkonzentration auf und sie sind langfristig bei Raumtemperatur nicht stabil und die aus der WO03007988 bekannten Formulierungen weisen ebenfalls eine relativ geringe
15 Proteinkonzentration auf.

Bei den bisher bekannten Formulierungen geringer Proteinkonzentration, werden bei intervenöser Verabreichung hohe Infusionsvolumina notwendig. Aufgabe der Erfindung war deshalb die Aufkonzentrierung
20 erfindungsgemäßer Antikörper, so dass durch Reduktion der zu applizierenden Volumina auch eine subkutane Applikation in Betracht gezogen werden kann. Subkutan zu applizierende Formulierungen dürfen ein Volumen von 1,0 – 1,5 ml nicht überschreiten und müssen ferner
25 euhydrisch pH 4,0 – 9,0 und isotonisch (290 mOsm) sein. Ein weiterer Vorteil subkutaner Formulierungen liegt in der Möglichkeit der Selbstverabreichung durch den Patienten. Allerdings sollte bei der Aufkonzentrierung die Stabilität des Proteins nicht beeinträchtigt werden,
30 d.h. der Anstieg an Zersetzungs- und Aggregationsprodukten sollte im Rahmen der Spezifikationen akzeptabel sein. Weiterhin sollten solche Formulierungen frei von toxikologisch bedenklichen Stoffen sein bzw. diese nur in physiologisch unbedenklichen Konzentrationen enthalten.

35 Da sich durch die zu erwartenden Schwierigkeiten bereits etablierte Proteinformulierungen im Allgemeinen nicht auf neue Protein-Wirkstoffe

- 4 -

übertragen lassen, war es Aufgabe der vorliegenden Erfindung, neue stabile, hochkonzentrierte Formulierungen für monoklonale Antikörper gegen den EGF-Rezeptor, beispielsweise Mab C225 (Cetuximab) und Mab h425 (EMD 72000), zu finden, so dass bei Herstellung, Lagerung, Transport und Applikation deren Wirksamkeit erhalten bleibt und diese Formulierungen keine toxikologisch bedenklichen Hilfsstoffe enthalten.

10 Zusammenfassung der Erfindung

Überraschenderweise lassen sich mit Hilfe von Ultrafiltrationsverfahren hochkonzentrierte pharmazeutische Zubereitungen von anti-EGFR-Antikörpern erhalten, die in einer flüssigen Formulierung Proteinkonzentrationen von 10 - 200 mg/ml, besonders bevorzugt von 50 - 180 mg/ml, besonders bevorzugt von 100 - 150 mg/ml ermöglichen. Die durch den Ultrafiltrationsprozess erhaltenen Formulierungen sind vorzugsweise über einen längeren Zeitraum stabil oder sie können bei Bedarf mit geeigneten stabilisierenden Hilfsstoffen versetzt oder durch nachfolgende Lyophilisierung stabilisiert werden.

Die erfindungsgemäßen Formulierungen sind physiologisch gut verträglich, leicht herstellbar, exakt dosierbar und über die Dauer der Lagerung, bei mechanischer Belastung und z.B. bei mehrfachen Einfrier- und Auftauvorgängen stabil.

Überraschenderweise wurde gefunden, dass die durch erfindungsgemäße Verfahren hergestellten hochkonzentrierten Formulierungen von anti-EGFR-Antikörpern einen Monomeranteil von > 99% enthalten. Die erhaltenen erfindungsgemäßen hochkonzentrierten, flüssigen Formulierungen mit einer Konzentration von 10 - 200 mg/ml, besonders bevorzugt von 50 - 180 mg/ml, besonders bevorzugt von 100 - 150 mg/ml

- 5 -

sind physikalisch und chemisch stabil, d.h. der es kommt zu keiner Veränderung des Monomergehaltes mit einhergehender Zunahme von löslichen Aggregaten, was als sehr kritisch im Hinblick auf Wirksamkeit und auf immunogene Nebenwirkungen anzusehen wäre (Schellekens H. (2002) Bioequivalence and the immunogenicity of biopharmaceuticals.: Nat. Rev. Drug Discov., v. 1, p. 457-462). Auch kommt es durch die angewandten Ultrafiltrationsverfahren zu keiner Änderung der Primärstruktur des Proteins. Außerdem zeigen sich hinsichtlich der mechanischen Stabilität und der thermischen Stabilität keine Nachteile gegenüber den niedrig konzentrierten Proteinformulierungen. Insbesondere liegen die charakterisierten Aggregationsprodukte auch für die erfindungsgemäßen hochkonzentrierten, flüssigen Antikörperformulierungen im Bereich der festgesetzten Spezifikationen.

Dies war nicht zu erwarten, da bei hochkonzentrierten Proteinformulierungen die Tendenz zur Instabilität weitaus größer ist als bei verdünnten Proteinformulierungen (Fields, G., Alonso, D., Stiger, D., Dill, K. (1992) "Theory for the aggregation of proteins and copolymers." J. Phys. Chem. 96, 3974-3981). Bei einer hohen Proteinkonzentration ist die "Packungsdichte" der Proteinmoleküle erhöht. Eine vermehrte Anzahl an Kollisionen ist demnach anzunehmen und es kann zu gelegentlichen Protein-Assoziationen kommen. Dieser Prozess erfolgt in der Regel durch Nukleations- und Wachstumsmechanismen, bei der die kritischen Nuklei oft lösliche assoziierte Proteine darstellen, die sich jedoch schnell in unlösliche Proteinpräzipitate (denaturiertes Protein) umwandeln können (Reithel, J.F. (1962) "The dissociation and association of protein structures", Adv. Protein Chem. 18, 123). Die Größe der Proteinaggregate erhöht sich mit steigender Proteinkonzentration, wie für das β -Lactoglobulin bereits gezeigt werden konnte (Roefs, S.P.F.M., De Kruij, K.G. (1994) "A model for the denaturation and aggregation of β -lactoglobulin" Eur. J. Biochem. 226, 883-889).

- 6 -

Die nachfolgend beschriebenen erfindungsgemäßen Formulierungen von anti-EGFR-Antikörpern zeichnen sich überraschenderweise durch einen oder mehrere Vorteile aus, ausgewählt unter: hohe Proteinkonzentration, hohe Stabilität, geringe Aggregationstendenz, geringe Viskosität, hohe Reinheit, Abwesenheit pharmazeutisch bedenklicher Agenzien und damit hohe Sicherheit, gute Verträglichkeit und Möglichkeit der direkten Verwendung.

Nachfolgend beschriebene erfindungsgemäße Herstellungsverfahren zeichnen sich überraschenderweise durch einen oder mehrere Vorteile aus, ausgewählt unter: Einfachheit, Zeit- und Kostenersparnis, Verwendung pharmazeutisch unbedenklicher Agenzien, hohe Ausbeute. Erfindungsgemäße Verfahren sind somit in der Durchführung vorzugsweise wesentlich einfacher, zeitsparender und kosteneffektiver als die in der Literatur beschriebenen Techniken, da überraschenderweise durch Ultrafiltration stabile, hochkonzentrierte, flüssige Formulierungen von anti-EGFR-Antikörpern erhalten werden, die obengenannte Vorteile aufweisen.

Gegenstand der Erfindung sind deshalb Verfahren zur Herstellung hochkonzentrierter, flüssiger Formulierungen enthaltend wenigstens einen anti-EGFR-Antikörper und/oder eine seiner Varianten und/oder Fragmente durch Ultrafiltration. Erfindungsgemäße Verfahren sind insbesondere dadurch gekennzeichnet, dass die erhaltenen hochkonzentrierten, flüssigen Formulierungen einen Gehalt wenigstens eines anti-EGFR-Antikörpers von 10 – 200 mg/ml, bevorzugt 50 – 180 mg/ml, besonders bevorzugt 100 – 150 mg/ml aufweisen.

Weiterhin sind erfindungsgemäße Verfahren dadurch gekennzeichnet, dass die anti-EGFR-Antikörper monoklonal sind und muriner oder humaner Herkunft, bevorzugt muriner Herkunft und chimär oder humanisiert. Besonders bevorzugt sind die anti-EGFR-Antikörper Mab

- 7 -

C225 (Cetuximab) oder Mab h425 (EMD72000) und/oder deren Varianten und/oder Fragmente.

5 Erfindungsgemäße Verfahren der Ultrafiltration umfassen Ultrafiltration und Tangentialflussfiltration (TFF).

Die Ultrafiltration erfindungsgemäßer der Antikörper erfolgt vorzugsweise in einem geeigneten Puffersystem, d.h. es ist keine Stabilisierung der
10 Reaktionslösungen durch weitere Hilfsstoffe, wie z.B. Detergenzien notwendig. Die Verwendung von Detergenzien in Zubereitungen zur parenteralen Anwendung ist generell zu vermeiden bzw. zu minimieren, da von ihnen ein nicht unerhebliches toxisches und immunogenes Potential
15 ausgeht (Sweetana S. & Akers M.J. (1996) Solubility principles and practices for parenteral drug dosage form development. PDA J. Pharm. Sci. Technol. 50, 330-342) und sie auch zur Veränderung der Sekundärstruktur von Proteinen führen können (Vermeer A.W.P. & Norde
20 W. (2000) The influence of the binding of low molecular weight surfactants on the thermal stability and secondary structure of IgG. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects 161, 139-150). So können die erhaltenen erfindungsgemäßen Formulierungen direkt in Arzneimitteln verwendet werden.

25 Bezüglich der erfindungsgemäßen anti-EGFR-Antikörper und im Rahmen der vorliegenden Erfindung, versteht man unter „biologisch aktiv“, „nativ“ und „wirksam“, dass erfindungsgemäße anti-EGFR-Antikörper auch nach
30 Überführung in erfindungsgemäße Formulierungen ihre biologische Wirkung ausüben können, insbesondere die Bindung an EGFR, Inhibition der Bindung von Liganden, insbesondere EGF, an den EGFR, Modulation, insbesondere Inhibition der EGFR-vermittelten Signaltransduktion und Prophylaxe oder Therapie von EGFR-vermittelten Erkrankungen.

35

- 8 -

anti-EGFR-Antikörper: Erfindungsgemäße anti-EGFR-Antikörper sind vorzugsweise monoklonal und muriner oder humaner Herkunft, besonders bevorzugt sind sie muriner Herkunft und chimär oder humanisiert. Bei dem gegen den Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors (EGFR) gerichteten Antikörper handelt es sich besonders bevorzugt um Mab C225 (Cetuximab) oder Mab h425 (EMD 72000) und/oder deren Varianten oder Fragmente. Weitere gegen den EGFR gerichtete Antikörper sind z.B. in der EP0586002 sowie in J. Natl. Cancer Inst. 1993, 85: 27-33 (Mab 528) beschrieben.

Mab C225 (Cetuximab, ErbituxTM): Mab C225 (Cetuximab) ist ein klinisch erprobter Antikörper, der an den EGF-Rezeptor bindet. Mab C225 (Cetuximab) ist ein chimärer Antikörper, dessen variable Regionen murinen und dessen konstante Regionen humanen Ursprungs sind. Er wurde erstmals von Naramura et al., Cancer Immunol. Immunotherapy 1993, 37: 343-349 sowie in WO 96/40210 A1 beschrieben.

Mab h425 (EMD 72000): Mab h425 (EMD 72000) ist ein humanisierter monoklonaler Antikörper (Mab), der aus dem murinen anti-EGFR-Antikörper 425 (Mab 425) erhalten wurde (EP0531472). Der murine monoklonale Antikörper Mab 425 wurde in der humanen Karzinomzelllinie A431 entwickelt, da er hier an ein extrazelluläres Epitop des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) bindet. Es wurde gefunden, dass er die Bindung von EGF inhibiert (Murthy et al., 1987). Erhöhte Expression von EGFR wird in malignen Geweben aus unterschiedlichen Quellen gefunden, so dass Mab 425 ein möglicher Wirkstoff zur Diagnose und therapeutischen Behandlung von humanen Tumoren ist. So wurde gefunden, dass Mab 425 in vitro Tumorzytotoxizität vermittelt und in vitro das Tumorstadium von Zelllinien epidermoider und colorektaler Karzinome unterdrückt (Rodeck et al., 1987). Außerdem konnte gezeigt werden, dass Mab 425 an Xenografts von humanen malignen Gliomen in Mäusen bindet (Takahashi et al., 1987). Seine humanisierten und

- 9 -

chimären Formen sind z.B. aus EP0531472; Kettleborough et al., Protein Engineering 1991, 4: 773-783; Bier et al., Cancer Chemother Pharmacol. 2001, 47: 519-524; Bier et al., Cancer Immunol. Immunother. 1998, 46: 167-173 bekannt. Mab h425 (EMD 72000) ist dabei ein in der klinischen Phase I/II befindlicher humanisierter Antikörper (h425), dessen konstanter Bereich sich aus einer κ und einer humanen γ -1-Kette zusammensetzt (EP0531472).

Humane anti-EGFR-Antikörper können nach der XenoMouse-Technologie bereitgestellt werden, wie in der WO9110741, WO9402602, WO9633735 beschrieben. Ein gemäß dieser Technologie hergestellter, in der klinischen Erprobung befindlicher Antikörper ist beispielsweise auch ABX-EGF (Abgenix, Crit. Rev. Oncol. Hematol. 2001, 38: 17-23; Cancer Research 1999, 59: 1236-43).

Antikörper: Antikörper oder Immunglobulin wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung im breitesten Umfang verwendet und betrifft insbesondere polyklonale Antikörper und multispezifische Antikörper (z.B. bispezifische Antikörper) und besonders bevorzugt intakte monoklonale Antikörper (Mab), die biologisch wirksam sind, sowie deren Varianten und Fragmente. Es sind auch Heteroantikörper, die aus zwei oder mehreren Antikörpern oder deren Fragmenten bestehen und/oder verschiedene Bindungsspezifitäten aufweisen und miteinander verbunden sind, umfasst. In Abhängigkeit von der Aminosäuresequenz ihrer konstanten Regionen können Antikörper verschiedenen „Antikörper- (Immunglobulin-) Klassen zugeordnet werden: IgA, IgD, IgE, IgG und IgM. Mehrere davon können weiter in Subklassen (Isotypen) unterteilt werden, beispielsweise IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 und IgA2. Antikörper haben gewöhnlich ein Molekulargewicht von etwa 150 kDa, bestehen aus zwei identischen leichten Ketten (L) und zwei identischen schweren Ketten (H). Monoklonale Antikörper werden aus einer Population homogener Zellen erhalten. Sie

- 10 -

sind hochspezifisch und gegen ein einziges Epitop gerichtet, während polyklonale Antikörper verschiedene Antikörper umfassen, die gegen unterschiedliche Epitope gerichtet sind. Verfahren zur Herstellung monoklonaler Antikörper umfassen beispielsweise die von Kohler und Milstein (Nature 256, 495 (1975)) und in Burdon et al., (1985) "Monoclonal Antibody Technology, The Production and Characterization of Rodent and Human Hybridomas", Eds, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Volume 13, Elsevier Science Publishers, Amsterdam beschriebene Hybridommethode. Sie können insbesondere durch bekannte rekombinante DNA-Techniken hergestellt werden (siehe z.B. US4816567). Monoklonale Antikörper können auch aus Phagenantikörperbibliotheken isoliert werden beispielsweise mithilfe der in Clackson et al. (Nature, 352:624-628 (1991)) und Marks et al. (J. Mol. Biol., 222:58, 1-597(1991)) beschriebenen Techniken.

Varianten und Fragmente: Bei Varianten (Muteine) von Antikörpern handelt es sich um strukturverwandte Proteine, beispielsweise solche, die durch Modifikation der Primärsequenz (Aminosäuresequenz), durch Glycoengineering (Varianten der Glykosylierungsstellen bzw -strukturen, auch deglykosylierte Proteine), durch PEGylierung, durch Herstellung in modifizierten Wirtszellen oder durch andere Techniken erhalten werden können. Erfindungsgemäße Varianten sind hierbei nicht auf die vorstehenden Beispiele beschränkt, sondern umfassen alle dem Fachmann bekannten Varianten erfindungsgemäßer Antikörper. Bei Fragmenten (Teilsegmenten) von Antikörpern handelt es sich um Spaltungsprodukte von Antikörpern, die beispielsweise durch limitierte enzymatische Verdauung mithilfe von Papain, Pepsin und Plasmin oder durch gentechnische Herstellung der Teilsegmente gewonnen werden. Typische Teilsegmente sind beispielsweise das bivalente $F(ab')_2$ -Fragment, das monovalente Fab-Fragment sowie das Fc-Fragment. (Lottspeich F., H. Zorbas (ed.), Bioanalytik, Heidelberg; Berlin: Spektrum Akademischer Verlag GmbH, (1998) pp.1035). Erfindungsgemäße

- 11 -

Fragmente sind hierbei nicht auf die vorstehenden Beispiele beschränkt, sondern umfassen alle dem Fachmann bekannten Fragmente erfindungsgemäßer Antikörper.

5 Pharmazeutische Zubereitung: Die Begriffe pharmazeutische Formulierung und pharmazeutische Zubereitung werden im Rahmen der vorliegenden Erfindung als Synonyme verwendet.

10 Wie hier verwendet bezieht sich „pharmazeutisch verträglich“ auf Arzneimittel, Präzipitationsreagenzien, Trägerstoffe, Hilfsstoffe, Stabilisatoren, Lösungsmittel und sonstige Agenzien, die die Verabreichung der daraus erhaltenen pharmazeutischen Zubereitungen
15 ohne unerwünschte physiologische Nebenwirkungen, wie Übelkeit, Schwindel, Verdauungsprobleme o.ä. an ein Säugetier ermöglichen.

Bei pharmazeutischen Zubereitungen zur parenteralen Verabreichung besteht die Forderung nach Isotonie, Euhydrie sowie nach Verträglichkeit
20 und Sicherheit der Formulierung (geringe Toxizität), der eingesetzten Hilfsstoffe und des Primärpackmittels. Überraschenderweise haben erfindungsgemäße hochkonzentrierte, flüssige Formulierungen von anti-EGFR-Antikörpern vorzugsweise den Vorteil, dass eine direkte
25 Verwendung möglich ist, da zur Herstellung physiologisch unbedenkliche Agenzien verwendet werden. Somit ist die Herstellung erfindungsgemäßer hochkonzentrierter, flüssiger Formulierungen von anti-EGFR-Antikörpern bei vorzugsweise gleichzeitig hoher Ausbeute an nativem und
30 pharmazeutisch unbedenklichem Protein hoher Reinheit, vorzugsweise einfach, zeitsparend und kostengünstig.

Bei der Ultrafiltration handelt es sich um ein druckgetriebenes semipermeable Membranverfahren zur Separation gelöster und
35 suspendierter Materialien. Das Trennprinzip beruht auf der Größe und Ausmaß des Moleküls, d.h. Substanzen, die kleiner als die Porengröße

- 12 -

5 sind, gelangen ins Filtrat (Permeat), während Substanzen, die größer als die Porengröße sind, im Retentat (Konzentrat) verbleiben. Die nötige Kraft, um die Trennung durchzuführen, kann durch Zentrifugalkräfte, eine Gas-Druckquelle (z.B. Stickstoff) oder eine Membranpumpe aufgebracht werden.

10 Erfindungsgemäße hochkonzentrierte, flüssige Formulierungen von anti-EGFR-Antikörpern können bevorzugt hergestellt werden, indem eine erfindungsgemäße anti-EGFR-Antikörper enthaltende Lösung mittels eines Ultrafiltrationsverfahrens aufkonzentriert wird. Zweckmäßigerweise wird hierzu einer Lösung mit einer definierten Konzentration an

15 erfindungsgemäßen anti-EGFR-Antikörpern (beispielsweise für C225:0,01 bis 150 mg/ml, bevorzugt 2 bis 100 mg/ml, besonders bevorzugt ca. 20 mg/ml, für EMD 72000: 0,01 bis 150 mg/ml, bevorzugt 5 bis 100 mg/ml, besonders bevorzugt ca 20 mg/ml), wie sie bei deren Herstellung gewonnen wird, in die Ultrafiltrationseinheit gegeben und unter definierten,

20 kontrollierten Druckbedingungen einem Konzentrationsprozess unterzogen. Liegt der Antikörper als Feststoff, beispielsweise als Lyophilisat, vor, kann die erfindungsgemäße hochkonzentrierte, flüssige Formulierung hergestellt werden, indem erfindungsgemäße anti-EGFR-Antikörper zunächst in Wasser oder einer einen oder mehrere der weiteren

25 Inhaltsstoffe enthaltenden wässrigen Lösung gelöst und anschließend dem Ultrafiltrationsprozess ausgesetzt wird.

Das durch den Ultrafiltrationsprozess erhaltene Produkt kann anschließend durch Zusatz der im Anhang aufgeführten Hilfsstoffen

30 stabilisiert werden. Die so erhaltene, den jeweiligen Antikörper enthaltende Lösung wird auf einen pH-Wert von 4 bis 10, bevorzugt pH 5 bis 9 eingestellt, sterilfiltriert und je nach Bedarf durch einen nachfolgenden Lyophilisierungsschritt zur Stabilisierung in eine feste Form überführt.

35 Die Reihenfolge der Zugabe der verschiedenen Hilfsstoffe oder des erfindungsgemäßen Antikörpers ist weitgehend unabhängig vom Herstellungsverfahren und liegt im Ermessen des Fachmanns.

- 13 -

Die anti-EGFR-Antikörper liegen in erfindungsgemäßen hochkonzentrierten, flüssigen Formulierungen vorzugsweise in biologisch aktiver Form vor und es kommt bei erfindungsgemäßen Verfahren vorzugsweise nicht zu einer Denaturierung der Antikörper. So bleibt die biologische Wirksamkeit des Proteins vorzugsweise erhalten.

In erfindungsgemäßen Verfahren können beispielsweise Polyethersulfon (PES), regenerierte Cellulose als Ultrafiltrations-Membranen verwendet werden: Der theoretisch denkbare Cutoff liegt im Bereich zwischen 5 und 500 kDa, vorzugsweise zwischen 30 und 50 kDa.

Die für Ultrafree-Zentrifugenröhrchen (Millipore) verwandten Zentrifugalkräfte liegen im Bereich von 1 - 20000*g, vorzugsweise im Bereich von 1000 - 12000*g, besonders bevorzugt bei 2000*g. Die bei der Amicon-Rührzelle (Millipore) angewandte Gasdruck liegen im Bereich von 0,1-5 psi, vorzugsweise bei 4 psi. Der bei der Labscale-TFF-Anlage (Millipore) angewandte Eingangsdruck liegt im Bereich von 0,1 - 85 psi, vorzugsweise im Bereich von 10 - 30 psi, besonders bevorzugt bei 20 psi. Der bei der Labscale-TFF-Anlage (Millipore) angewandte Ausgangsdruck liegt im Bereich von 0,1 - 85 psi, vorzugsweise im Bereich von 5 - 20 psi, besonders bevorzugt bei 10 psi.

In erfindungsgemäßen Verfahren können beispielsweise folgende Puffer verwendet werden: Phosphatpuffer: Na- (oder K-)Phosphat; auch mit Zusatz von Isotisierungsmittel (z.B. Na-(oder K-)Cl), möglicher pH ca 6,0 - 8,2; Citrat-Puffer: Na-Citrat oder Citronensäure, möglicher pH ca 2,2 - 6,5, auch mit Zusatz von Isotonisierungsmitteln (z.B. NaCl), auch andere Salze sind zur Isotonisierung denkbar, Succinat-Puffer pH ca 4,8 - 6,3, Acetat-Puffer, z.B. Natriumacetat, pH ca 2,5 - 6,0; Histidin-Puffer pH ca 6,0 - 7,8;

- 14 -

5 Glutaminsäure pH 8,0 bis 10,2; Glycin (N,N-bis(2-Hydroxyethyl)glycin) pH ca. 8,6 bis 10,6; Glycinat-Puffer pH ca 6.5 – 7.5; Imidazol pH 6,2 bis 7,8; Kaliumchlorid pH ca. 1,0 bis 2,2; Lactat-Puffer pH ca 3.0 – 6.0; Maleat-Puffer pH ca 2.5 – 5.0; Tartrat-Puffer pH ca 3.0 – 5.0; Tris: pH ca 6.8 – 7.7; Phosphat-Citrat-Puffer.

10 In erfindungsgemäßen Verfahren können vorstehend genannte Puffer beispielsweise in folgenden Konzentrationen verwendet werden: 1mM bis 200 mM, bevorzugt 2 – 20 mM, besonders bevorzugt ca. 10 mM.

15 Vorzugsweise können nachfolgende pH-Bereiche verwendet werden: pH 4 – 10, bevorzugt ist pH = IEP +/- 2 pH-Einheiten (2 pH Einheiten um den isoelektrischen Punkt des Proteins).

20 Vorzugsweise können nachfolgende Isotonisierungsmittel verwendet werden (übliche Konzentrationen): Natriumchlorid ca. 5 mM - 305 mM; Kaliumchlorid; Glucose; Glycerin; Dextrose 4-5.5 mM; Natriumchlorid 0.5-0.9 mM, Natriumsulfat 1-1.6 mM.

25 Vorzugsweise können nachfolgende Stoffe zur Viskositätserniedrigung verwendet werden: Natriumchlorid, Argininhydrochlorid, Natriumthiocyanat, Ammoniumthiocyanat, Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Calciumchloride, Zinkchloride, Natriumacetat.

Vorzugsweise können nachfolgende Stabilisatoren verwendet werden:

30 1) Aminosäuren

(ca. 1 – 100 mg/ml, besonders bevorzugt 3-10 mg/ml, als Hydrochlorid)
Arginin, Ornithin, Lysin, Histidin, Glutaminsäure, Asparaginsäure, Isoleucin, Leucin, Alanin, Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan, Methionin, Serin, Prolin.

35 2) Zucker und Zuckeralkohole

- 15 -

(ca. 1 – 200 mg/ml, besonders bevorzugt 30-65 mg/ml) Saccharose, Lactose, Glucose, Mannose, Maltose, Galactose, Fructose, Sorbose, Raffinose, Trehalose, Glucosamin, N-Methylglucosamin, Galactosamin, Neuraminsäure.

5 3) Antioxidantien

Acetonnatriumbisulfit 0.2%, Ascorbinsäure 0.01%, Ascorbinsäureester 0.015%, Butylhydroxyanisol (BHA) 0.02%, Butylhydroxytoluol (BHT) 0.02%, Cystein 0.5%, Nordihydroguaiaretinsäure (NDGA) 0.01%, Monothioglycerol 0.5%, Natriumbisulfit 0.15%, Natriummetabisulfit 0.2%, Tocopherole 0.5%, Glutathion 0.1%.

10 4) Konservierungsmittel

m-Cresol ca 0,1 - 0,3%, Chlrocresol ca. 0,1 - 0,3%, Phenol ca. 0,5%, Benzylalkohol ca. 1,0 – 2,0 %, Methylparaben ca. 0,2 %, Propylparaben ca. 0,02%, Butylparaben ca. 0,015%, Chlorbutanol ca. 0,25 - 0,5%, Phenylmercurinitrat ca. 0,002%, Phenylmercuriacetat ca. 0,002%, Thimersal ca. 0,01 - 0,02%, Benzalkoniumchlorid ca. 0,01%, Benzethoniumchlorid ca. 0,01%.

20 5) Cyclodextrine

z.B. Hydroxypropyl- β -cyclodextrin, Sulfobutylethyl- β -cyclodextrin, γ -Cyclodextrin.

25 6) Albumine

Humanes Serum Albumin (HSA), Bovines Serum Albumin (BSA):

7) Polyhydric Alkohole

Glycerol, Ethanol, Mannitol.

30 8) Salze

Acetat-Salze (z.B. Natriumacetat), Magnesiumchlorid, Calciumchlorid, Tromethamin, EDTA (z.B. Na-EDTA).

35 Die Erfindung umfasst auch alle dem Fachmann bekannten und denkbaren Hydrate, Salze und Derivate der vorstehend genannten Agenzien.

35 monoklonaler sind und können oder humaner Herkunft, bevorzugt humaner Herkunft und chimär oder humanisiert. Besonders bevorzugt sind die anti-EGFR-Antikörper Mab C225 (Cetuximab) oder Mab h425 (EMD72000) und/oder deren Varianten und/oder Fragmente.

December 14, 2004

This is to inform you that the document requested in your order dated 12-10-2004 is a true reproduction of the official office record copy of that document:

60543549 CERTIFIED PAT APP AS FILED- PSF 3
PAGE 16, MISSING

- ☐ The enclosed office document is a reproduction from the official office record copy and has been recorded using high quality scanning or microfilm equipment. Copies of page/papers that were not scannable have not been included, nor have pages/papers received after the original filing date. Copies of these pages/papers may be ordered separately.
- ☐ The enclosed document is a reproduction of the best available source of the official office record copy of that document.

If you have any questions or need additional information, please contact our Customer Service Department.

Mailing Address:

Mail Stop Document Services,
Director of the U.S. Patent and Trademark Office
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Delivery Address:

U.S. Patent and Trademark Office
Office of Public Records, Customer Service
1213 Jefferson Davis Highway, Suite 300
Arlington VA 22202

Order your copies of USPTO documents on the Web. It's fast, easy, and secure! Go to
(<http://ebiz1.uspto.gov/oems25p/index.html>) and order today!

Voice: (703) 308-9726 Fax: (703) 308-7048 E-Mail: <mailto:DSD@USPTO.GOV>
Ref:WM 1260305

- 17 -

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind hochkonzentrierte, flüssige
Formulierungen enthaltend wenigstens einen anti-EGFR-Antikörper
und/oder eine seiner Varianten und/oder Fragmente erhältlich durch
5 erfindungsgemäße Verfahren, d.h. durch oben beschriebene Verfahren
der Ultrafiltration.

Gegenstand der Erfindung sind außerdem erfindungsgemäße,
10 hochkonzentrierte, flüssige Formulierungen von anti-EGFR-Antikörpern als
lagerstabile Arzneimittel.

Erfindungsgemäße, hochkonzentrierte, flüssige Formulierungen von anti-
15 EGFR-Antikörpern können neben erfindungsgemäßen Antikörpern
gegebenenfalls Träger- und/oder Hilfsstoffe und/oder weitere
pharmazeutische Wirkstoffe enthalten.

Vorzugsweise ermöglichen erfindungsgemäße Verfahren,
20 hochkonzentrierte Formulierungen herzustellen, ohne dass es zu
ungünstigen unerwünschten Aggregationen der erfindungsgemäßen
Antikörper oder zu unerwünscht hoher Viskosität kommt, wie sie bei
gewöhnlichen, hochkonzentrierten Proteinlösungen beobachtet werden
25 kann. So lassen sich mithilfe erfindungsgemäßer erfindungsgemäßer
Verfahren applikationsfertige Lösungen mit hohem Wirkstoffanteil
herstellen. In jüngerer Zeit werden vermehrt möglichst hochkonzentrierte
Formulierungen von Proteinwirkstoffen gefordert. Die meisten Antikörper,
30 die zur Therapie eingesetzt werden, werden im Bereich mg/kg dosiert.
Eine hohe Dosis und geringe zu applizierende Volumina (z.B. ca. 1 bis 1,5
ml bei subkutaner Applikation) zeigen den Bedarf an hochkonzentrierten
Proteinzubereitungen mit Konzentrationen von mehr als 100 mg/ml.
Außerdem können hochkonzentrierte Proteinformulierungen in
35 präklinischen Tests zur Untersuchung der Unbedenklichkeit und

- 18 -

Wirksamkeit in-vitro und in-vivo (am Tiermodell), in klinischen Tests zur Untersuchung der Unbedenklichkeit und Wirksamkeit beim Menschen und in der klinischen Anwendung des Produktes (insbesondere bei der subkutanen Applikation) erhebliche Vorteile aufweisen. Ihre Vorteile bestehen insbesondere darin, dass ein geringeres Volumen der Zubereitung angewendet werden muss. Im Gegensatz zur Infusion oder Injektion von relativ niedrig konzentrierten Proteinarzneimitteln ist dadurch z.B. eine subkutane Applikation von Proteinarzneimitteln für den Patienten möglich. Die subkutane Applikation von Proteinarzneimitteln kann verschiedene Gründe haben. Beispielsweise kann ein spezielles Targeting erwünscht sein, welches in Zusammenhang mit einem „therapeutischen Fenster“ steht. Des weiteren hat eine subkutane Applikation den Vorteil, dass der Patient selbst die Applikation vornehmen kann, ohne auf ärztliches Personal angewiesen zu sein. Das Beispiel des Insulins zeigt deutlich diese Vorteile. Da die Injektionen zur subkutanen Applikation jedoch maximal 1 - 1,5 ml betragen können, sind häufig hochkonzentrierte Proteinformulierungen mit mehr als 100 mg/ml nötig.

Überraschenderweise lassen sich mithilfe erfindungsgemäßer Verfahren hochkonzentrierte, flüssige Formulierungen von anti-EGFR-Antikörpern erhalten, die die bei Proteinkonzentrationen von 10 – 200 mg/ml, bevorzugt von 50 – 180 mg/ml, besonders bevorzugt von 100 – 150 mg/ml nicht obengenannte Nachteile aufweisen.

Die Grenze bei bekannten hochkonzentrierten Formulierungen von Immunglobulinen liegt bei gebrauchsfertigen flüssigen Formulierungen von Antikörpern normalerweise bei 2 - 50mg/ml (Humira®)

Mit den erfindungsgemäßen Verfahren lassen sich jedoch auch deutlich höher konzentrierte und dennoch stabile Formulierungen herstellen, was nicht zu erwarten war. Somit können durch erfindungsgemäße Verfahren hochkonzentrierte stabile Antikörperformulierungen erhalten werden, die eine verringerte Viskosität und Aggregationstendenz verglichen mit

- 19 -

bekannten hochkonzentrierten, flüssigen Antikörperformulierungen und dadurch dadurch die Handhabbarkeit bei der parenteralen Verabreichung erleichtert wird.

5 Vorteilhaft können aus den erfindungsgemäßen Formulierungen antikörperhaltige Lösungen mit einem pH-Wert von 4 bis 10, bevorzugt mit einem pH-Wert von 5 bis 9, und einer Osmolalität von 250 bis 350 mOsmol/kg hergestellt werden. Erfindungsgemäße Formulierungen somit
10 weitgehend schmerzfrei intravenös, intraarteriell und auch subkutan direkt verabreicht werden. Daneben kann die Zubereitung auch Infusionslösungen, wie z.B. Glukoselösung, isotonische Kochsalzlösung oder Ringerlösung, die auch weitere Wirkstoffe enthalten können,
15 zugesetzt werden, so dass auch größere Wirkstoffmengen appliziert werden können.

Die erfindungsgemäßen Formulierungen sind physiologisch gut verträglich, leicht herstellbar, exakt dosierbar und vorzugsweise über die Dauer der
20 Lagerung sowie des Transports und bei mehrfachen Einfrier- und Auftauvorgängen hinsichtlich Gehalt, Zersetzungsprodukten und Aggregaten stabil. Sie können bei Kühlschranktemperatur (2-8°C) und bei Raumtemperatur (23-27°C) und 60% relativer Luftfeuchtigkeit (r.F.) über
25 einen längeren Zeitraum vorzugsweise stabil gelagert werden. Vorzugsweise sind erfindungsgemäße Formulierungen auch bei höheren Temperaturen und Luftfeuchtigkeiten vergleichsweise stabil.

30 Der Ausdruck "wirksame Menge" bedeutet die Menge eines Arzneimittels oder eines pharmazeutischen Wirkstoffes, die eine biologische oder medizinische Antwort in einem Gewebe, System, Tier oder Menschen hervorruft, die z.B. von einem Forscher oder Mediziner gesucht oder
35 angestrebt wird.

- 20 -

Darüber hinaus bedeutet der Ausdruck "therapeutisch wirksame Menge" eine Menge, die, verglichen zu einem entsprechenden Subjekt, das diese Menge nicht erhalten hat, folgendes zur Folge hat: verbesserte Heilbehandlung, Heilung, Prävention oder Beseitigung einer Krankheit, eines Krankheitsbildes, eines Krankheitszustandes, eines Leidens, einer Störung oder Verhinderung von Nebenwirkungen oder auch die Verminderung des Fortschreitens einer Krankheit, eines Leidens oder einer Störung. Die Bezeichnung "therapeutisch wirksame Menge" umfasst auch die Mengen, die wirkungsvoll sind, die normale physiologische Funktion zu erhöhen.

Arzneimittel können in Form von Dosisseinheiten, die eine vorbestimmte Menge an Wirkstoff pro Dosisinheit enthalten, dargereicht werden. Eine solche Einheit kann beispielsweise 0,5 mg bis 1 g, vorzugsweise 1 mg bis 800 mg, eines erfindungsgemäßen Wirkstoffs enthalten, je nach dem behandelten Krankheitszustand, dem Verabreichungsweg und dem Alter, Gewicht und Zustand des Patienten. Bevorzugte Dosierungseinheitsformulierungen sind solche, die eine Tagesdosis oder Teildosis, wie oben angegeben, oder einen entsprechenden Bruchteil davon eines Wirkstoffs enthalten. Weiterhin lassen sich solche Arzneimittel mit einem der im pharmazeutischen Fachgebiet allgemein bekannten Verfahren herstellen.

Arzneimittel lassen sich zur Verabreichung über einen beliebigen geeigneten Weg, beispielsweise auf oralem (einschließlich buccalem bzw. sublingualen), rektalem, pulmonalen, nasalem, topischem (einschließlich buccalem, sublingualen oder transdermale), vaginalem oder parenteralem (einschließlich subkutanem, intramuskulärem, intravenösem oder intradermale) Wege, anpassen. Solche Arzneimittel können mit allen im pharmazeutischen Fachgebiet bekannten Verfahren hergestellt werden, indem beispielsweise der Wirkstoff mit dem bzw. den Trägerstoff(en) oder Hilfsstoff(en) zusammengebracht wird.

- 21 -

5 Zur Verabreichung der erfindungsgemäßer Arzneimittel eignet sich vorzugsweise die parenterale Applikation. Im Falle der parenteralen Applikation sind die intravenöse, subkutane oder intradermale Applikation besonders bevorzugt. Im Falle der intravenösen Applikation kann die Injektion direkt oder auch als Zusatz zu Infusionslösungen erfolgen.

10 Insbesondere eignen sich erfindungsgemäße Arzneimittel zur subkutanen oder intradermalen Applikation, da sich mithilfe erfindungsgemäßer hochkonzentrierter, flüssiger Formulierungen die für die parentrale oder subkutane Verabreichung erforderlichen gering zu applizierenden Volumina realisieren lassen.

15 Die subkutane Applikation hat den Vorteil, dass der Patient ohne medizinische fachmännische Hilfe sich selbst das Arzneimittel verabreichen kann. Erfindungsgemäße Formulierungen von anti-EGFR-Antikörpern eignen sich auch zur Herstellung von parenteral zu applizierenden Arzneimitteln mit kontrollierter, gleichmäßiger und/oder
20 verzögerter Wirkstofffreisetzung (slow-release, sustained-release, controlled release), beispielsweise auch zur Herstellung von Depot-Formulierungen, die für den Patienten vorteilhaft sind, da eine Applikation nur in größeren Zeitintervallen notwendig ist. Erfindungsgemäße
25 pharmazeutische Zubereitungen können auch direkt in den Tumor injiziert werden und so direkt am bestimmungsgemäßen Wirkort ihre Wirkung entfalten.

30 Zu den an die parenterale Verabreichung angepassten Arzneimitteln gehören wässrige und nichtwässrige sterile Injektionslösungen, die Antioxidantien, Puffer, Bakteriostatika und Solute, durch die die Formulierung isotonisch mit dem Blut des zu behandelnden Empfängers gemacht wird, enthalten; sowie wässrige und nichtwässrige sterile
35 Suspensionen, die Suspensionsmittel und Verdicker enthalten können. Die Formulierungen können in Einzeldosis- oder Mehrfachdosisbehältern, z.B.

- 22 -

versiegelten Ampullen und Fläschchen, dargereicht und in
gefriergetrocknetem (lyophilisiertem) Zustand gelagert werden, so dass
nur die Zugabe der sterilen Trägerflüssigkeit, z.B. Wasser für Injektions-
zwecke, unmittelbar vor Gebrauch erforderlich ist. Rezepturmäßig
hergestellte Injektionslösungen und Suspensionen können aus sterilen
Pulvern, Granulaten und Tabletten hergestellt werden.

Die erfindungsgemäßen Formulierungen von anti-EGFR-Antikörpern
lassen sich auch in Form von Liposomenzuführsystemen, wie z.B. kleinen
unilamellaren Vesikeln, großen unilamellaren Vesikeln und multilamellaren
Vesikeln, verabreichen. Liposomen können aus verschiedenen
Phospholipiden, wie z.B. Cholesterin, Stearylamin oder Phosphatidyl-
cholinen, gebildet werden.

An die topische Verabreichung angepasste Arzneimittel können als
Salben, Cremes, Suspensionen, Lotionen, Lösungen, Pasten, Gele,
Sprays, Aerosole oder Öle formuliert sein, in die erfindungsgemäße
Formulierungen eingebracht werden.

Für Behandlungen des Auges oder anderer äußerer Gewebe, z.B. Mund
und Haut, werden die Formulierungen vorzugsweise in topische Salbe
oder Creme eingebracht und appliziert. Bei Formulierung zu einer Salbe
können erfindungsgemäße Formulierungen entweder in eine paraffinische
oder einer mit Wasser mischbare Cremebasis eingebracht werden.
Alternativ kann eine erfindungsgemäße Formulierung zu einer Creme mit
einer Öl-in-Wasser-Cremebasis oder einer Wasser-in-Öl-Basis formuliert
werden.

Zu den an die topische Applikation am Auge angepassten Arzneimittel
gehören Augentropfen.

- 23 -

An die rektale Verabreichung angepasste Arzneimittel können in Form von Zäpfchen oder Einläufen dargereicht werden.

5 An die Verabreichung durch Inhalation angepasste Arzneimittel umfassen feinpartikuläre Stäube oder Nebel, die mittels verschiedener Arten von unter Druck stehenden Dosierspendern mit Aerosolen, Verneblern oder Insufflatoren erzeugt werden können.

10 An die vaginale Verabreichung angepasste Arzneimittel können als Pessare, Tampons, Cremes, Gele, Pasten, Schäume oder Sprayformulierungen dargereicht werden.

15 Es versteht sich, dass die erfindungsgemäßen Arzneimittel neben den obigen besonders erwähnten Bestandteilen andere im Fachgebiet übliche Mittel mit Bezug auf die jeweilige Art der pharmazeutischen Formulierung enthalten können.

20 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Sets (Kits) bestehend aus getrennten Packungen von

- 25 a) einer erfindungsgemäßen Formulierung, enthaltend eine wirksame Menge eines anti-EGFR-Antikörpers, bevorzugt eines monoklonalen anti-EGFR-Antikörpers, besonders bevorzugt von Mab C225 (Cetuximab) oder Mab h425 (EMD 72000) und/oder deren Varianten oder Fragmenten, und
- 30 b) einer Formulierung, enthaltend eine wirksamen Menge eines weiteren Arzneimittelwirkstoffs.

35 Das Set enthält geeignete Behälter, wie Schachteln oder Kartons, individuelle Flaschen, Beutel oder Ampullen. Das Set kann z.B. separate Ampullen enthalten, in denen jeweils eine erfindungsgemäße Formulierung, enthaltend eine wirksame Menge eines erfindungsgemäßen

- 24 -

anti-EGFR-Antikörpers und in einer Formulierung eines weiteren Arzneimittelwirkstoffs in gelöster oder in lyophilisierter Form vorliegt.

5 Eine therapeutisch wirksame Menge eines erfindungsgemäßen anti-EGFR-Antikörpers hängt von einer Reihe von Faktoren ab, einschließlich z.B. dem Alter und Gewicht des Patienten, dem exakten Krankheitszustand, der der Behandlung bedarf, sowie seines Schweregrads, der Beschaffenheit der Formulierung sowie dem
10 Verabreichungsweg, und wird letztendlich von dem behandelnden Arzt bzw. Tierarzt festgelegt. Jedoch liegt eine wirksame Menge eines erfindungsgemäßen anti-EGFR-Antikörpers für die Behandlung von neoplastischem Wachstum, z.B. Dickdarm- oder Brustkarzinom, im
15 allgemeinen im Bereich von 0,1 bis 100 mg/kg Körpergewicht des Empfängers (Säugers) pro Tag und besonders typisch im Bereich von 1 bis 10 mg/kg Körpergewicht pro Tag. Somit läge für einen 70 kg schweren erwachsenen Säuger die tatsächliche Menge pro Tag für gewöhnlich
20 zwischen 70 und 700 mg; wobei diese Menge als Einzeldosis pro Tag oder üblicher in einer Reihe von Teildosen (wie z.B. zwei, drei, vier, fünf oder sechs) pro Tag gegeben werden kann, so dass die Gesamttagesdosis die gleiche ist. Die Bestimmung des geeigneten Antikörper-Titers erfolgt nach dem Fachmann bekannten Methoden. Die für die Verabreichung
25 vorgesehene Dosierung ist im Allgemeinen ausreichend, um die gewünschte tumor-hemmende Wirkung zu erzielen. Die Dosierung sollte jedoch auch möglichst gering gewählt werden, so dass keine Nebenwirkungen, wie unerwünschte Kreuzreaktionen, anaphylaktische Reaktionen o.ä.
30 auftreten.

Erfindungsgemäße Medikamente können insbesondere zur Prophylaxe und/oder zur Behandlung von Krankheiten und Krankheitszuständen
35 verwendet werden.

- 25 -

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist deshalb auch die Verwendung erfindungsgemäßer hochkonzentrierter, flüssiger Formulierungen von anti-EGFR-Antikörpern zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Tumoren und/oder Tumormetastasen, wobei der Tumor aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus Gehirntumor, Tumor des Urogenitaltrakts, Tumor des lymphatischen Systems, Magentumor, Kehlkopftumor, Monozytenleukämie, Lungenadenokarzinom, kleinzelliges Lungenkarzinom, Bauchspeicheldrüsenkrebs, Glioblastom und Brustkarzinom.

In verschiedenen in vitro und in vivo Studien konnte gezeigt werden, dass die Blockade des EGFR durch Antikörper auf unterschiedlichen Ebenen gegen Tumore, beispielsweise durch Hemmung der Krebszellproliferation, Verringerung der tumorvermittelten Angiogenese, Induktion der Krebszellapoptose und Verstärkung der toxischen Wirkungen der Strahlentherapie und der herkömmlichen Chemotherapie.

Arzneimittel enthaltend erfindungsgemäße Formulierungen können EGFR wirksam regulieren, modulieren oder hemmen und können deshalb zur Vorbeugung und/oder Behandlung von Erkrankungen im Zusammenhang mit unregulierter oder gestörter EGFR-Aktivität eingesetzt werden. Insbesondere lassen sich die erfindungsgemäßen Formulierungen von anti-EGFR-Antikörpern deshalb bei der Behandlung gewisser Krebsformen einsetzen, sowie bei durch pathologische Angiogenese bedingten Erkrankungen wie diabetische Retinopathie oder Entzündungen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist deshalb die Verwendung von erfindungsgemäßen Formulierungen zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Krankheiten, die durch EGFR und/oder durch EGFR-vermittelte Signaltransduktion verursacht, vermittelt und/oder propagiert werden.

Erfindungsgemäße Arzneimittel eignen sich besonders zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Krebs, einschließlich solider Karzinome, wie zum Beispiel Karzinome (z.B. der Lungen, des Pankreas, der Schilddrüse, der Harnblase oder des Kolons), myeloische Erkrankungen (z.B. myeloische Leukämie) oder Adenome (z.B. villöses Kolonadenom), pathologische Angiogenese und metastatische Zellmigration. Die Arzneimittel sind ferner nützlich bei der Behandlung der Komplementaktivierungs-abhängigen chronischen Entzündung (Niculescu et al. (2002) Immunol. Res., 24:191-199) und durch HIV-1 (Human Immunodeficiency Virus Typ 1) induzierte Immunschwäche (Popik et al. (1998) J Virol, 72: 6406-6413).

Außerdem eignen sich die vorliegenden Arzneimittel als pharmazeutische Wirkstoffe für Säugetiere, insbesondere für den Menschen, bei der Behandlung von EGFR-bedingten Krankheiten. Der Ausdruck „EGFR-bedingte Krankheiten“ bezieht sich auf pathologische Zustände, die von der EGFR-Aktivität abhängig sind. EGFR ist entweder direkt oder indirekt an den Signaltransduktionswegen verschiedener Zellaktivitäten, darunter Proliferation, Adhäsion und Migration sowie Differenzierung beteiligt. Zu den Krankheiten, die mit EGFR-Aktivität assoziiert sind, zählen die Proliferation von Tumorzellen, die pathologische Gefäßneubildung, die das Wachstum fester Tumore fördert, Gefäßneubildung im Auge (diabetische Retinopathie, altersbedingte Makula-Degeneration und dergleichen) sowie Entzündung (Schuppenflechte, rheumatoide Arthritis und dergleichen).

Gewöhnlich werden die hier besprochenen Erkrankungen in zwei Gruppen eingeteilt, in hyperproliferative und nicht-hyperproliferative Erkrankungen. In diesem Zusammenhang werden Psoriasis, Arthritis, Entzündungen, Endometriose, Vernarbung, gutartige Prostatahyperplasie, immunologische Krankheiten, Autoimmunkrankheiten und Immunschwächekrankheiten als nicht-krebsartige Krankheiten angesehen, von denen Arthritis, Entzündung, immunologische Krankheiten, Autoimmunkrankheiten und

- 27 -

Immunschwächekrankheiten gewöhnlich als nicht-hyperproliferative Erkrankungen angesehen werden.

5 In diesem Zusammenhang sind Hirnkrebs, Lungenkrebs,
Plattenepithelkrebs, Blasenkrebs, Magenkrebs, Pankreaskrebs,
Leberkrebs, Nierenkrebs, Kolorektalkrebs, Brustkrebs, Kopfkrebs,
Halskrebs, Ösophaguskrebs, gynäkologischer Krebs, Schilddrüsenkrebs,
10 Lymphome, chronische Leukämie und akute Leukämie als krebsartige
Erkrankungen anzusehen, die alle gewöhnlich zur Gruppe der hyper-
proliferative Erkrankungen gezählt werden. Insbesondere krebsartiges
Zellwachstum und insbesondere durch EGFR direkt oder indirekt
vermitteltes krebsartiges Zellwachstum ist eine Erkrankung, die ein Ziel der
15 vorliegenden Erfindung darstellt.

Es kann gezeigt werden, dass die erfindungsgemäßen Arzneimittel in
einem Xenotransplantat-Tumor-Modell eine in vivo antiproliferative
Wirkung aufweisen. Die erfindungsgemäßen Arzneimittel werden an einen
20 Patienten mit einer hyperproliferativen Erkrankung verabreicht, z. B. zur
Inhibition des Tumorwachstums, zur Verminderung der mit einer lympho-
proliferativen Erkrankung einhergehenden Entzündung, zur Inhibition der
Transplantatabstoßung oder neurologischer Schädigung aufgrund von
25 Gewebereparatur usw. Die vorliegenden Arzneimittel sind nützlich für
prophylaktische oder therapeutische Zwecke. Wie hierin verwendet, wird
der Begriff „behandeln“ als Bezugnahme sowohl auf die Verhinderung von
Krankheiten als auch die Behandlung vorbestehender Leiden verwendet.
30 Die Verhinderung von Proliferation wird durch Verabreichung der
erfindungsgemäßen Arzneimittel vor Entwicklung der evidenten Krankheit,
z. B. zur Verhinderung des Tumorwachstums, Verhinderung meta-
statischen Wachstums, der Herabsetzung von mit kardiovaskulärer
Chirurgie einhergehenden Restenosen usw. erreicht. Als Alternative
35 werden die Arzneimittel zur Behandlung andauernder Krankheiten durch

- 28 -

Stabilisation oder Verbesserung der klinischen Symptome des Patienten verwendet.

5 Der Wirt oder Patient kann jeglicher Säugerspezies angehören, z.B. einer Primatenspezies, besonders Menschen; Nagetieren, einschließlich Mäusen, Ratten und Hamstern; Kaninchen; Pferden, Rindern, Hunden, Katzen usw. Tiermodelle sind für experimentelle Untersuchungen von Interesse, wobei sie ein Modell zur Behandlung einer Krankheit des Menschen zur Verfügung stellen.

15 Die Empfänglichkeit einer bestimmten Zelle gegenüber der Behandlung mit den erfindungsgemäßen Arzneimitteln kann durch in vitro-Tests bestimmt werden. Typischerweise wird eine Kultur der Zelle mit einem erfindungsgemäßen Arzneimittel bei verschiedenen Konzentrationen für eine Zeitdauer inkubiert, die ausreicht, um den Wirkstoffen zu ermöglichen, Zelltod zu induzieren oder Migration zu inhibieren, gewöhnlich zwischen ungefähr einer Stunde und einer Woche. Zu in vitro-Tests können kultivierte Zellen aus einer Biopsieprobe verwendet werden. Die nach der Behandlung zurückbleibenden lebensfähigen Zellen werden dann gezählt.

25 Die Dosis variiert abhängig von den verwendeten spezifischen Arzneimitteln, der spezifischen Erkrankung, dem Patientenstatus usw.. Typischerweise ist eine therapeutische Dosis ausreichend, um die unerwünschte Zellpopulation im Zielgewebe erheblich zu vermindern, während die Lebensfähigkeit des Patienten aufrechterhalten wird. Die Behandlung wird im Allgemeinen fortgesetzt, bis eine erhebliche Reduktion vorliegt, z. B. mindestens ca. 50 % Verminderung der spezifischen Zellzahl und kann fortgesetzt werden, bis im Wesentlichen keine unerwünschten Zellen mehr im Körper nachgewiesen werden.

- 29 -

Zur Identifikation von EGFR-Inhibitoren stehen verschiedene Assay-Systeme zur Verfügung. Beim Scintillation-Proximity-Assay (Sorg et al., J. of Biomolecular Screening, 2002, 7, 11-19) und dem FlashPlate-Assay wird die radioaktive Phosphorylierung eines Proteins oder Peptids als

Substrat mit γ ATP gemessen. Bei Vorliegen einer inhibitorischen Verbindung ist kein oder ein vermindertes radioaktives Signal nachweisbar.

Ferner sind die Homogeneous Time-resolved Fluorescence Resonance Energy Transfer- (HTR-FRET-) und Fluoreszenzpolarisations- (FP-)

Technologien als Assay-Verfahren nützlich (Sills et al., J. of Biomolecular Screening, 2002, 191-214).

Andere nicht radioaktive ELISA-Assay-Verfahren verwenden spezifische Phospho-Antikörper (Phospho-AK). Der Phospho-AK bindet nur das phosphorylierte Substrat. Diese Bindung ist mit einem zweiten Peroxidase-konjugierten Anti-Schaf-Antikörper durch Chemilumineszenz nachweisbar (Ross et al., 2002, Biochem. J., unmittelbar vor der Veröffentlichung, Manuskript BJ20020786).

Es gibt viele mit einer Deregulation der Zellproliferation und des Zelltods (Apoptose) einhergehende Erkrankungen und Krankheitszustände. Die Erkrankungen und Krankheitszustände, die durch erfindungsgemäße Arzneimittel behandelt, verhindert oder gelindert werden können umfassen die nachfolgend aufgeführten Erkrankungen und Krankheitszustände, sind jedoch nicht darauf beschränkt. Die erfindungsgemäßen Arzneimittel sind nützlich bei der Behandlung und/oder Prophylaxe einer Reihe verschiedener Erkrankungen und Krankheitszustände, bei denen Proliferation und/oder Migration glatter Muskelzellen und/oder Entzündungszellen in die Intimaschicht eines Gefäßes vorliegt, resultierend in eingeschränkter Durchblutung dieses Gefäßes, z. B. bei neointimalen okklusiven Läsionen. Zu okklusiven Transplantat-Gefäßerkrankungen von Interesse zählen Atherosklerose, koronare Gefäßerkrankung nach Transplantation, Venentransplantat-

- 30 -

stenose, peri-anastomotische Prothesenrestenose, Restenose nach Angioplastie oder Stent-Platzierung und dergleichen.

5 Die vorliegende Erfindung umfasst die Verwendung der erfindungs-
gemäßen Arzneimittel zur Behandlung oder Vorbeugung von Krebs. Ein
besonders bevorzugter Gegenstand der Erfindung ist deshalb die
Verwendung erfindungsgemäßer fester Formen von anti-EGFR-
Antikörpern zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung und/oder
10 Prophylaxe von Tumoren und/oder Tumormetastasen, wobei der Tumor
besonders bevorzugt aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus
Gehirntumor, Tumor des Urogenitaltrakts, Tumor des lymphatischen
Systems, Magentumor, Kehlkopftumor, Monozytenleukämie,
15 Lungenadenokarzinom, kleinzelliges Lungenkarzinom,
Bauchspeicheldrüsenkrebs, Glioblastom und Brustkarzinom, ohne darauf
beschränkt zu sein.

20 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung von
erfindungsgemäßen Arzneimittel zur Herstellung eines Medikaments zur
Behandlung von Krankheiten, ausgewählt aus der Gruppe der krebsartigen
Erkrankungen bestehend aus Plattenepithelkrebs, Blasenkrebs,
Magenkrebs, Leberkrebs, Nierenkrebs, Kolorektalkrebs, Brustkrebs,
25 Kopfkrebs, Halskrebs, Ösophaguskrebs, gynäkologischem Krebs,
Schilddrüsenkrebs, Lymphom, chronischer Leukämie und akuter
Leukämie.

30 Die erfindungsgemäßen Arzneimittel können an Patienten zur Behandlung
von Krebs verabreicht werden. Die vorliegenden Arzneimittel hemmen die
Tumorangiogenese und beeinflussen so das Wachstum von Tumoren (J.
Rak et al. Cancer Research, 55:4575-4580, 1995). Die
angiogenesehemmenden Eigenschaften der erfindungsgemäßen
35 Arzneimittel eignen sich auch zur Behandlung bestimmter Formen von
Blindheit, die mit Retina-Gefäßneubildung in Zusammenhang stehen.

- 31 -

5 Gegenstand der Erfindung ist deshalb außerdem die Verwendung
erfindungsgemäßer Formulierungen von anti-EGFR-Antikörpern zur
Herstellung eines Medikaments zur Behandlung und/oder Prophylaxe von
Krankheiten, die durch Angiogenese verursacht, vermittelt und/oder
propagiert werden.

10 Eine derartige Krankheit, an der Angiogenese beteiligt ist, ist eine
Augenkrankheit, wie Retina-Vaskularisierung, diabetische Retinopathie,
altersbedingte Makula-Degeneration und dergleichen.

15 Gegenstand der Erfindung ist deshalb auch die Verwendung
erfindungsgemäßer Formulierungen von anti-EGFR-Antikörpern zur
Herstellung eines Medikaments zur Behandlung und/oder Prophylaxe von
Krankheiten, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Retina-
Vaskularisierung, diabetischer Retinopathie, altersbedingter Makula-
20 Degeneration und/oder Entzündungskrankheiten.

25 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung
erfindungsgemäßer Formulierungen von anti-EGFR-Antikörpern zur
Behandlung und/oder Prophylaxe von Krankheiten, ausgewählt aus der
Gruppe bestehend aus Psoriasis, rheumatoide Arthritis, Kontaktdermatitis,
Spät-Typ der Überempfindlichkeitsreaktion, Entzündungen, Endometriose,
Vernarbung, gutartiger Prostatahyperplasie, immunologischer Krankheiten,
Autoimmunkrankheiten und Immunschwächekrankheiten.

30 Gegenstand der Erfindung ist auch die Verwendung erfindungsgemäßer
Formulierungen von anti-EGFR-Antikörpern zur Behandlung und/oder
Prophylaxe von Knochen-Pathologien, ausgewählt aus der Gruppe
bestehend aus Osteosarkom, Osteoarthritis und Rachitis.

35

- 32 -

Weiterhin können die erfindungsgemäße Arzneimittel verwendet werden, um bei gewissen existierenden Krebschemotherapien und -bestrahlungen additive oder synergistische Effekte bereitzustellen, und/oder können dazu verwendet werden, um die Wirksamkeit gewisser existierender Krebschemotherapien und -bestrahlungen wiederherzustellen.

Gegenstand der Erfindung ist deshalb auch die Verwendung erfindungsgemäßer Formulierungen von anti-EGFR-Antikörpern zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Krankheiten, wobei eine therapeutisch wirksame Menge eines erfindungsgemäßen anti-EGFR-Antikörpers in Kombination mit einer Verbindung aus der Gruppe 1) Östrogenrezeptormodulator, 2) Androgenrezeptormodulator, 3) Retinoidrezeptormodulator, 4) Zytotoxikum, 5) antiproliferatives Mittel, 6) Prenyl-Proteintransferaseinhibitoren, 7) HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren, 8) HIV-Protease-Inhibitoren, 9) Reverse-Transkriptase-Inhibitoren, 10) Wachstumsfaktorrezeptor-Inhibitoren sowie 11) Angiogenese-Inhibitoren verabreicht wird.

Gegenstand der Erfindung ist deshalb auch die Verwendung erfindungsgemäßer Formulierungen von anti-EGFR-Antikörpern zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Krankheiten, wobei eine therapeutisch wirksame Menge eines erfindungsgemäßen anti-EGFR-Antikörpers in Kombination mit Radiotherapie und einer Verbindung aus der Gruppe 1) Östrogenrezeptormodulator, 2) Androgenrezeptormodulator, 3) Retinoidrezeptormodulator, 4) Zytotoxikum, 5) antiproliferatives Mittel, 6) Prenyl-Proteintransferaseinhibitoren, 7) HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren, 8) HIV-Protease-Inhibitoren, 9) Reverse-Transkriptase-Inhibitoren, 10) Wachstumsfaktorrezeptor-Inhibitoren sowie 11) Angiogenese-Inhibitoren verabreicht wird.

- 33 -

Die erfindungsgemäßen Arzneimittel können so auch gemeinsam mit anderen gut bekannten Therapeutika, die aufgrund ihrer jeweiligen Eignung für das behandelte Leiden ausgewählt werden, verabreicht werden. So wären zum Beispiel bei Knochenleiden Kombinationen
5 günstig, die antiresorptiv wirkende Bisphosphonate, wie Alendronat und Risedronat, Integrinblocker (wie sie weiter unten definiert werden), wie $\alpha\beta 3$ -Antagonisten, bei der Hormontherapie verwendete konjugierte Östrogene wie Prempro®, Premarin® und Endometrion®; selektive
10 Östrogenrezeptormodulatoren (SERMs) wie Raloxifen, Droloxifen, CP-336,156 (Pfizer) und Lasofoxifen, Kathepsin-K-Inhibitoren und ATP-Protonenpumpeninhibitoren enthalten.

Die vorliegenden Arzneimittel eignen sich auch zur Kombination mit bekannten Antikrebsmitteln. Zu diesen bekannten Antikrebsmitteln zählen
15 die folgenden: Östrogenrezeptormodulatoren, Androgenrezeptormodulatoren, Retinoidrezeptormodulatoren, Zytotoxika, antiproliferative Mittel, Prenyl-Proteintransferaseinhibitoren, HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren, HIV-Protease-Inhibitoren, Reverse-Transkriptase-Inhibitoren,
20 Wachstumsfaktor-Inhibitoren sowie Angiogeneseinhibitoren. Die vorliegenden Verbindungen eignen sich insbesondere zur gemeinsamen Anwendung mit Radiotherapie.

„Östrogenrezeptormodulatoren“ bezieht sich auf Verbindungen, die die
25 Bindung von Östrogen an den Rezeptor stören oder diese hemmen, und zwar unabhängig davon, wie dies geschieht. Zu den Östrogenrezeptormodulatoren zählen zum Beispiel Tamoxifen, Raloxifen, Idoxifen, LY353381, LY 117081, Toremifen, Fulvestrant, 4-[7-(2,2-Dimethyl-1-oxopropoxy-4-methyl-2-[4-[2-(1-piperidinyl)ethoxy]phenyl]-2H-
30 1-benzopyran-3-yl]phenyl-2,2-dimethylpropanoat, 4,4'-Dihydroxybenzophenon-2,4-dinitrophenylhydrazon und SH646, was jedoch keine Einschränkung darstellen soll.

„Androgenrezeptormodulatoren“ bezieht sich auf Verbindungen, die die
35 Bindung von Androgenen an den Rezeptor stören oder diese hemmen, und zwar unabhängig davon, wie dies geschieht. Zu den

- 34 -

Androgenrezeptormodulatoren zählen zum Beispiel Finasterid und andere 5 α -Reduktase-Inhibitoren, Nilutamid, Flutamid, Bicalutamid, Liarozol und Abirateron-acetat.

5 „Retinoidrezeptormodulatoren“ bezieht sich auf Verbindungen, die die Bindung von Retinoiden an den Rezeptor stören oder diese hemmen, und zwar unabhängig davon, wie dies geschieht. Zu solchen Retinoidrezeptormodulatoren zählen zum Beispiel Bexaroten, Tretinoin, 13-cis-Retinsäure, 9-cis-Retinsäure, α -Difluormethylornithin, ILX23-7553, trans-N-(4'-Hydroxyphenyl)retinamid und N-4-Carboxyphenylretinamid.

10 „Zytotoxika“ bezieht sich auf Verbindungen, die in erster Linie durch direkte Einwirkung auf die Zellfunktion zum Zelltod führen oder die die Zellmyose hemmen oder diese stören, darunter Alkylierungsmittel, Tumornekrosefaktoren, interkalierende Mittel, Mikrotubulin-Inhibitoren und
15 Topoisomerase-Inhibitoren.

Zu den Zytotoxika zählen zum Beispiel Tirapazimin, Sertene, Cachectin, Ifosfamid, Tasonermin, Lonidamin, Carboplatin, Altretamin, Prednimustin, Dibromdulcit, Ranimustin, Fotemustin, Nedaplatin, Oxaliplatin,
20 Temozolomid, Heptaplatin, Estramustin, Improsulfan-tosylat, Trofosfamid, Nimustin, Dibrospidium-chlorid, Pumitepa, Lobaplatin, Satraplatin, Proflomycin, Cisplatin, Irofulven, Dexifosfamid, cis-Amindichlor(2-methylpyridin)platin, Benzylguanin, Glufosfamid, GPX100,
25 (trans,trans,trans)-bis-mu-(hexan-1,6-diamin)-mu-[diaminplatin(II)]bis[diamin(chlor)platin(II)]-tetrachlorid, Diarizidinylspermin, Arsentrioxid, 1-(11-Dodecylamino-10-hydroxyundecyl)-3,7-dimethylxanthin, Zorubicin, Idarubicin, Daunorubicin, Bisantren, Mitoxantron, Pirarubicin,
30 Pinafid, Valrubicin, Amrubicin, Antineoplaston, 3'-Desamino-3'-morpholino-13-desoxo-10-hydroxycarminomycin, Annamycin, Galarubicin, Elnafid, MEN10755 und 4-Desmethoxy-3-desamino-3-aziridiny-4-methylsulfonyldaunorubicin (siehe WO 00/50032), was jedoch keine Einschränkung darstellen soll.

35 Zu den Mikrotubulin-Inhibitoren zählen zum Beispiel Paclitaxel, Vindesinsulfat, 3',4'-Dideshydro-4'-desoxy-8'-norvincal leukoblastin, Docetaxol,

- 35 -

Rhizoxin, Dolastatin, Mivobulin-isethionat, Auristatin, Cemadotin, RPR109881, BMS184476, Vinflunin, Cryptophycin, 2,3,4,5,6-pentafluor-N-(3-fluor-4-methoxyphenyl)benzolsulfonamid, Anhydrovinblastin, N,N-dimethyl-L-valyl-L-valyl-N-methyl-L-valyl-L-prolyl-L-prolin-t-butylamid, TDX258 und BMS188797.

Topoisomerase-Inhibitoren sind zum Beispiel Topotecan, Hycaptamin, Irinotecan, Rubitecan, 6-Ethoxypropionyl-3',4'-O-exo-benzyliden-chartreusin, 9-Methoxy-N,N-dimethyl-5-nitropirazolo[3,4,5-kl]acridin-2-(6H)propanamin, 1-Amino-9-ethyl-5-fluor-2,3-dihydro-9-hydroxy-4-methyl-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':b,7]indolizino[1,2b]chinolin-10,13(9H,15H)-dion, Lurtotecan, 7-[2-(N-Isopropylamino)ethyl]-(20S)camptothecin, BNP1350, BNPI1100, BN80915, BN80942, Etoposid-phosphat, Teniposid, Sobuzoxan, 2'-Dimethylamino-2'-desoxy-etoposid, GL331, N-[2-(Dimethylamino)ethyl]-9-hydroxy-5,6-dimethyl-6H-pyrido[4,3-b]carbazol-1-carboxamid, Asulacrin, (5a,5aB,8aa,9b)-9-[2-[N-[2-(Dimethylamino)ethyl]-N-methylamino]ethyl]-5-[4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl]-5,5a,6,8,8a,9-hexahydrofuro(3',4':6,7)naphtho(2,3-d)-1,3-dioxol-6-on, 2,3-(Methylendioxy)-5-methyl-7-hydroxy-8-methoxybenzo[c]phenanthridinium, 6,9-Bis[(2-aminoethyl)amino]benzo[g]isochinolin-5,10-dion, 5-(3-Aminopropylamino)-7,10-dihydroxy-2-(2-hydroxyethylaminomethyl)-6H-pirazolo[4,5,1-de]acridin-6-on, N-[1-[2-(Diethylamino)ethylamino]-7-methoxy-9-oxo-9H-thioxanthen-4-ylmethyl]formamid, N-(2-(Dimethylamino)-ethyl)acridin-4-carboxamid, 6-[[2-(Dimethylamino)-ethyl]amino]-3-hydroxy-7H-indeno[2,1-c]chinolin-7-on und Dimesna.

Zu den „antiproliferativen Mitteln“ zählen Antisense-RNA- und -DNA-Oligonucleotide wie G3139, ODN698, RVASKRAS, GEM231 und INX3001, sowie Antimetaboliten wie Enocitabin, Carmofur, Tegafur, Pentostatin, Doxifluridin, Trimetrexat, Fludarabin, Capecitabin, Galocitabin, Cytarabin-ocfosfat, Fosteabin-Natriumhydrat, Raltitrexed, Paltitrexid, Emitefur, Tiazofurin, Decitabin, Nolatrexed, Pemetrexed, Nelzarabin, 2'-Desoxy-2'-methylidencytidin, 2'-Fluormethylen-2'-desoxycytidin, N-[5-(2,3-Dihydrobenzofuryl)sulfonyl]-N'-(3,4-dichlorphenyl)harnstoff, N6-[4-Desoxy-

- 36 -

4-[N2-[2(E),4(E)-tetradecadienoyl]glycylamino]-L-glycero-B-L-manno-
heptopyranosyl]adenin, Aplidin, Ecteinasidin, Troxacitabine, 4-[2-Amino-
4-oxo-4,6,7,8-tetrahydro-3H-pyrimidino[5,4-b][1,4]thiazin-6-yl-(S)-ethyl]-
2,5-thienoyl-L-glutaminsäure, Aminopterin, 5-Flurouracil, Alanosin, 11-
Acetyl-8-(carbamoyloxymethyl)-4-formyl-6-methoxy-14-oxa-1,11-diaza-
tetracyclo(7.4.1.0.0)-tetradeca-2,4,6-trien-9-yllessigsäureester, Swainsonin,
Lometrexol, Dexrazoxan, Methioninase, 2'-cyan-2'-desoxy-N4-palmitoyl-1-
B-D-Arabinofuranosylcytosin und 3-Aminopyridin-2-carboxaldehyd-
thiosemicarbazon. Die „antiproliferativen Mittel“ beinhalten auch andere
monoklonale Antikörper gegen Wachstumsfaktoren als bereits unter den
„Angiogenese-Inhibitoren“ angeführt wurden, wie Trastuzumab, sowie
Tumorsuppressorgene, wie p53, die über rekombinanten virusvermittelten
Gentransfer abgegeben werden können (siehe z.B. US-Patent Nr.
6,069,134). Erfindungsgemäße Arzneimittel können auch in Kombination
mit allen weiteren dem Fachmann bekannten therapeutischen Antikörpern
oder im Zusammenhang mit obengenannter Krankheiten geeigneten
pharmazeutischen Wirkstoffen verabreicht werden.

Weiterhin können erfindungsgemäße Formulierungen von anti-EGFR-
Antikörpern zur Isolierung und zur Untersuchung der Aktivität oder
Expression von EGFR verwendet werden. Außerdem eignen sie sich
insbesondere zur Verwendung in diagnostischen Verfahren zu
Erkrankungen im Zusammenhang mit unregulierter oder gestörter EGFR-
Aktivität.

Für diagnostische Zwecke können erfindungsgemäße Antikörper
beispielsweise radioaktiv markiert werden. Ein bevorzugtes
Markierungsverfahren ist die Iodogen-Methode (Fraker et al., 1978). Für
diagnostische Zwecke wird der Antikörper besonders bevorzugt als
F(ab')₂ Fragment verwendet. Dadurch werden hervorragende Ergebnisse
erzielt, so dass keine Hintergrund-Subtraktion notwendig ist. Solche
Fragmente können nach bekannten Methoden hergestellt werden (e.g.,

- 37 -

Herlyn et al., 1983). Im Allgemeinen wird ein Pepsin-Verdau in bei saurem pH-Wert durchgeführt und die Fragmente durch Protein A-SepharoseTM Chromatographie von unverdaulichem IgG und Fragmenten schwerer Ketten getrennt.

5

Die anti-EGFR-Antikörper zeigen in erfindungsgemäßen Formulierungen bevorzugt eine vorteilhafte biologische Aktivität, die in Enzym-Assays, wie in den Beispielen beschrieben, leicht nachweisbar ist. In derartigen auf Enzymen basierenden Assays zeigen und bewirken die erfindungsgemäßen Antikörper bevorzugt einen inhibierenden Effekt, der gewöhnlich durch IC₅₀-Werte in einem geeigneten Bereich, bevorzugt im mikromolaren Bereich und bevorzugter im nanomolaren Bereich dokumentiert wird.

10

15

Nachweise von Proteingröße, struktureller Integrität, Reinheit oder Glykosylierungsmuster der erfindungsgemäßen der erfindungsgemäßen Antikörper in erfindungsgemäßen Formulierungen umfassen, ohne darauf beschränkt zu sein, SE-HPLC, Peptid-Mapping (Verdau), N-terminale Sequenzierung, SDS-Page, Tris-Glycin-Gradient-Gel (nicht-reduzierend), FTIR-Methode (Fourier transform infrared spectra), CD (circular dichroism), RAMAN Spektroskopie, Kohlenhydratfärbung (PAS-Methode), Oligosaccharid-Profilierung, Bestimmung der Monosaccharid-Zusammensetzung oder isoelektrische Fokussierung.

20

25

Die Stabilität erfindungsgemäßer Formulierungen lässt sich beispielsweise, ohne darauf beschränkt zu sein, mithilfe von Stabilitätsprogrammen bestimmen, z.B. einer Lagerung bei 25°C und 60% relativer Luftfeuchte und bei 40°C und 70% relativer Luftfeuchte über einen längeren Zeitraum hinweg und Bestimmung der Stabilität oder strukturellen Integrität des Proteins in regelmäßigen Intervallen beispielsweise durch obengenannte Nachweismethoden (SE-HPLC, FT-IR; SDS-PAGE (reduzierend oder nicht-reduzierend)) nachweisen.

30

35

- 38 -

Nachweismethoden zur biologischen Aktivität oder Wirksamkeit
erfindungsgemäßer Antikörper in erfindungsgemäßen Formulierungen
umfassen beispielsweise, ohne darauf beschränkt zu sein, ELISA,
5 biologische Zellassays, FTIR oder CD.

Nachweismethoden verminderter Aggregationstendenz
erfindungsgemäßer hochkonzentrierte Formulierungen umfassen
10 beispielsweise, ohne darauf beschränkt zu sein, visuelle Kontrolle, Sub-
visible particles Analyse, Nephelometrie oder Turbidimetrie, Dynamic
Light Scattering Characterization.

15 Beispiel 1: Herstellung einer hochkonzentrierten flüssigen anti-EGFR-
Antikörperformulierung durch Tangentialflussfiltration (TFF)

20 380 ml Protein (17 mg/ml in 10 mM Phosphat + 145 mM NaCl, pH 7.2)
werden mittels einer Labscale-TFF-Analge (Millipore) mit eingebauter
Polyethersulfon-Ultrafiltrationsmembran mit einem Cutoff von 30 kDa für
22 6min bei einem Eingangsdruck von 20 psi und einem Ausgangsdruck
von 10 psi aufkonzentriert. Das erhaltene Retentat weist eine
25 Proteinkonzentration von ca. 132mg/ml auf. Die Ausbeute beträgt 85%.

oder

30 470 ml Protein (1 7mg/ml in 10mM Citrat) werden mittels einer Labscale-
TFF-Analge (Millipore) mit eingebauter Polyethersulfon-
Ultrafiltrationsmembran mit einem Cutoff von 30 kDa für 226 min bei
einem Eingangsdruck von 20 psi und einem Ausgangsdruck von 10 psi
aufkonzentriert. Das erhaltene Retentat weist eine Proteinkonzentration
35 von ca. 123mg/ml auf. Die Ausbeute beträgt 95%.

- 39 -

**Beispiel 2: Herstellung einer hochkonzentrierten flüssigen Formulierung
von anti-EGFR-Antikörpern durch gerührte Ultrafiltration**

5

25 ml Protein (10 mg/ml in 10 mM Phosphat + 145 mM NaCl, pH 7.2)
werden mittels einer Amicon-Rührzelle mit eingebauter Polyethersulfon-
Ultrafiltrationsmembran mit einem Cutoff von 30 kDa für 144 min bei
10 einem Stickstoff-Gasdruck von 4 bar aufkonzentriert. Das erhaltene
Retentat weist eine Proteinkonzentration von ca. 92 mg/ml auf. Die
Ausbeute beträgt 95%.

15

oder

20

25 ml Protein (10 mg/ml in 10 mM Citrat, pH 5,5) werden mittels einer
Amicon-Rührzelle mit eingebauter Polyethersulfon-Ultrafiltrationsmembran
mit einem Cutoff von 30 kDa für 168min bei einem Stickstoff-Gasdruck von
4bar aufkonzentriert. Das erhaltene Retentat weist eine
Proteinkonzentration von ca. 82 mg/ml auf. Die Ausbeute beträgt 95%.

25

**Beispiel 3: Herstellung einer hochkonzentrierten flüssigen Formulierung
von anti-EGFR-Antikörpern durch Ultrafiltration unter Einwirkung von
Zentrifugalkräften**

30

15 ml Protein (2 mg/ml in 10 mM Phosphat + 145 mM NaCl, pH 7.2)
werden in einem Ultrafree-Zentrifugenröhrchen (Millipore) mit einer
Polyethersulfon-Ultrafiltrationsmembran mit einem Cutoff von 30 kDa bei:
2000*g für 90 min zentrifugiert. Das erhaltene Retentat weist eine
Proteinkonzentration von ca. 116mg/ml auf. Die Ausbeute beträgt 95%.

35

- 40 -

Beispiel 14: Untersuchung auf lösliche Aggregate der hochkonzentrierten flüssigen Formulierung von anti-EGFR-Antikörpern

5 Die in den Beispielen 1 bis 3 erhaltenen Retentate wurden mittels SE-HPLC auf den Gehalt an löslichen Aggregaten untersucht. Dabei war der Anteil an Monomer nach Aufkonzentrierung >99%.

10 **Beispiel 5: Untersuchung auf Nativität der hochkonzentrierten flüssigen Formulierung von anti-EGFR-Antikörpern**

15 Die im Beispiel 1 erhaltenen Retentate wurden FT-IR-spektrometrisch untersucht. Dabei waren die Amid 1-2. Ableitung-Spektren des Ausgangsmaterials vor Aufkonzentrierung mittels Tangentialflussfiltration als auch des erhaltenen Retentats kongruent.

20

25

30

35

- 41 -

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung einer hochkonzentrierten, flüssigen Formulierung enthaltend wenigstens einen anti-EGFR-Antikörper und/oder eine seiner Varianten und/oder Fragmente durch Ultrafiltration.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die erhaltene hochkonzentrierte, flüssige Formulierung einen Gehalt eines anti-EGFR-Antikörpers von 10 – 200 mg/ml aufweist.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die erhaltene hochkonzentrierte, flüssige Formulierung einen Gehalt eines anti-EGFR-Antikörpers von 50 – 180 mg/ml aufweist.
4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die erhaltene hochkonzentrierte, flüssige Formulierung einen Gehalt eines anti-EGFR-Antikörpers von 100 – 150 mg/ml aufweist.
5. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass der anti-EGFR-Antikörper monoklonal ist und muriner oder humaner Herkunft ist.
6. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass der anti-EGFR-Antikörper muriner Herkunft ist und chimär oder humanisiert ist.
7. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass der anti-EGFR-Antikörper Mab C225 (Cetuximab) oder Mab h425 (EMD72000) ist.

- 42 -

8. Hochkonzentrierte, flüssige Formulierung enthaltend wenigstens einen anti-EGFR-Antikörper und/oder eine seiner Varianten und/oder Fragmente.

5 9. Hochkonzentrierte, flüssige Formulierung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass die hochkonzentrierte, flüssige Formulierung einen Gehalt eines anti-EGFR-Antikörpers von 10 – 200 mg/ml aufweist.

10 10. Hochkonzentrierte, flüssige Formulierung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass die hochkonzentrierte, flüssige Formulierung einen Gehalt eines anti-EGFR-Antikörpers von 50 – 180 mg/ml aufweist.

15 11. Hochkonzentrierte, flüssige Formulierung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass die hochkonzentrierte, flüssige Formulierung einen Gehalt eines anti-EGFR-Antikörpers von 100 – 150 mg/ml aufweist.

20 12. Hochkonzentrierte, flüssige Formulierung nach einem oder mehreren der Ansprüche 8 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass der anti-EGFR-Antikörper monoklonal ist und muriner oder humaner Herkunft ist.

25 13. Hochkonzentrierte, flüssige Formulierung nach einem oder mehreren der Ansprüche 8 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass der anti-EGFR-Antikörper muriner Herkunft ist und chimär oder humanisiert ist.

30 14. Hochkonzentrierte, flüssige Formulierung nach einem oder mehreren der Ansprüche 8 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass der anti-

- 43 -

EGFR-Antikörper Mab C225 (Cetuximab) oder Mab h425 (EMD72000) ist.

- 5 15. Hochkonzentrierte, flüssige Formulierung enthaltend wenigstens einen anti-EGFR-Antikörper und/oder eine seiner Varianten und/oder Fragmente erhältlich durch ein Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 7.
- 10 16. Hochkonzentrierte, flüssige Formulierung nach einem oder mehreren der Ansprüche 8 bis 15 als lagerstabiles Arzneimittel.
- 15 17. Hochkonzentrierte, flüssige Formulierung nach einem oder mehreren der Ansprüche 8 bis 16, dadurch gekennzeichnet dass sie gegebenenfalls Träger- und/oder Hilfsstoffe und/oder weitere pharmazeutische Wirkstoffe enthält.
- 20 18. Verwendung einer hochkonzentrierten, flüssigen Formulierung nach einem oder mehreren der Ansprüche 8 bis 17 zur Herstellung eines Medikaments.
- 25 19. Verwendung einer hochkonzentrierten, flüssigen Formulierung nach einem oder mehreren der Ansprüche 8 bis 17 zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Tumoren und/oder Tumormetastasen.
- 30 20. Verwendung nach Anspruch 19, wobei der Tumor aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus Gehirntumor, Tumor des Urogenitaltrakts, Tumor des lymphatischen Systems, Magentumor, Kehlkopftumor, Monozytenleukämie, Lungenadenokarzinom, kleinzelliges Lungenkarzinom, Bauchspeicheldrüsenkrebs,
- 35 Glioblastom und Brustkarzinom.

- 44 -

Zusammenfassung

5 Die Erfindung betrifft Verfahren zur Herstellung hochkonzentrierter,
flüssiger Formulierungen enthaltend wenigstens einen anti-EGFR-
Antikörper und/oder eine seiner Varianten und/oder Fragmente,
insbesondere monoklonale Antikörpern gegen den EGF-Rezeptor,
besonders bevorzugt von Mab C225 (Cetuximab) und Mab h425 (EMD
10 72000), durch Ultrafiltration. Die Erfindung betrifft weiterhin
hochkonzentrierte, flüssige Formulierungen von anti-EGFR-Antikörpern,
insbesondere von monoklonalen Antikörpern gegen den EGF-Rezeptor,
besonders bevorzugt von Mab C225 (Cetuximab) und Mab h425 (EMD
15 72000) und/oder deren Varianten und/oder Fragmente, dadurch
gekennzeichnet, dass die hochkonzentrierte, flüssige Formulierungen
einen Gehalt von anti-EGFR-Antikörpern von 10 – 200, bevorzugt 50 – 180
mg/ml, besonders bevorzugt von 100 – 150 mg/ml aufweisen und deren
20 Verwendung.